

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 21720091152223

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

一氧化氮通过调节红树植物秋茄根部钠钾
平衡增强其耐盐能力的研究

Nitric oxide increases salt tolerance of a mangrove species

Kandelia obovata by mediating Na^+/K^+ homeostasis in root

under high salinity

熊端业

指导教师姓名: 郑海雷 教授

专 业 名 称: 植 物 学

论文提交日期: 2012 年 05 月

论文答辩时间: 2012 年 06 月

学位授予日期: 2012 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012 年 06 月

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
第 1 章 前 言	1
1.1 植物耐盐研究进展.....	1
1.1.1 盐胁迫对植物的伤害.....	1
1.1.2 植物体内离子平衡的重建及其调控机制.....	2
1.2 一氧化氮 (NO) 对植物影响研究进展.....	4
1.2.1 NO 的理化性质.....	4
1.2.2 植物体内 NO 的生物合成.....	4
1.2.3 NO 在植物生长发育及响应逆境胁迫中的作用.....	6
1.3 红树植物耐盐机制及研究进展.....	8
1.3.1 红树植物对盐分的形态适应.....	8
1.3.2 红树植物的离子平衡机制.....	8
1.3.3 红树植耐盐性的分子机制.....	9
1.4 非损伤微测技术 (NMT)	10
1.5 本论文的研究内容和目的意义.....	12
第 2 章 材料与方法	13
2.1 实验材料的培养与处理.....	13
2.1.1 材料采集和培养.....	13
2.1.2 材料的处理.....	13
2.2 主要的试剂和仪器设备.....	13
2.2.1 主要的试剂.....	13
2.2.2 主要的仪器设备.....	14
2.3 秋茄根部钠、钾含量的 ICP-MS 测定	14
2.4 秋茄根部钠、钾含量的 X-ray 微区分析	14

2.5 秋茄根尖钠、钾净流量的 NMT 测定.....	15
2.6 秋茄根部抗盐相关蛋白质的 Western-blot 分析	16
2.6.1 蛋白质的提取.....	16
2.6.2 蛋白印迹 (Western blot)	16
2.7 秋茄根组织 RNA 的提取和耐盐相关基因核心片段的克隆	17
2.7.1 秋茄根组织 RNA 的提取	17
2.7.2 秋茄根中耐盐相关基因的克隆.....	17
2.7.2.1 引物设计.....	17
2.7.2.2 PCR 扩增	18
2.7.2.3 PCR 产物的回收及纯化	19
2.7.2.4 克隆回收片段与 T-载体的连接	20
2.7.2.5 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞的制备和转化.....	20
2.8 实时荧光定量 PCR.....	21
2.9 数据统计、分析及作图.....	22
第 3 章 结果与分析	23
3.1 NO 对高盐处理下秋茄根中钠、钾离子含量的影响.....	23
3.2 NO 对高盐胁迫下秋茄根中钠、钾离子区域分布的影响.....	25
3.3 NO 对高盐处理下秋茄根中钠、钾净流速率的影响.....	26
3.3.1 稳定状态下净 Na ⁺ 流速率	27
3.3.2 稳定状态下净 K ⁺ 流速率.....	27
3.3.3 药理试剂对盐处理下秋茄根尖钠、钾净流速率的影响.....	27
3.4 Western-blot 分析 NO 对抗盐相关蛋白表达的影响	30
3.4.1 Western-blot 分析 NO 对质膜 H ⁺ -ATPase 蛋白表达的影响	30
3.4.2 Western-blot 分析 NO 对质膜 Ca ²⁺ -ATPase 蛋白表达的影响.....	31
3.4.3 Western-blot 分析 NO 对液泡膜 Na ⁺ /H ⁺ 逆向转运蛋白表达的影响.....	32
3.5 秋茄 <i>SOS1</i> 、 <i>NHX1</i> 、 <i>HAI</i> 、 <i>VHA-c1</i> 以及 <i>AKT1</i> 基因的克隆	33
3.5.1 秋茄总 RNA 的提取与质量检测	33
3.5.2 秋茄 <i>SOS1</i> 基因核心片段的克隆.....	34
3.5.3 秋茄 <i>NHX1</i> 基因核心片段的克隆.....	37

3.5.4 秋茄 <i>HAI</i> 基因核心片段的克隆	39
3.5.5 秋茄 <i>VHA-c1</i> 基因核心片段的克隆	42
3.5.6 秋茄 <i>AKT1</i> 基因核心片段的克隆	45
3.6 秋茄 <i>SOS1</i> 、 <i>NHX1</i> 、 <i>HAI</i> 、 <i>VHA-c1</i> 、 <i>AKT1</i> 和内参 <i>18S rRNA</i> 基因实时荧光定量 PCR 条件的确定	49
3.7 实时荧光定量 PCR 分析 NO 对 <i>SOS1</i> 、 <i>HAI</i> 、 <i>NHX1</i> 、 <i>VHA-c1</i> 、 <i>AKT1</i> 基因表达的影响	55
3.7.1 实时荧光定量 PCR 分析 NO 对 Na ⁺ 外排相关基因 <i>SOS1</i> 和 <i>HAI</i> 表达影响	55
3.7.2 实时荧光定量 PCR 分析 NO 对 Na ⁺ 区域化基因 <i>NHX1</i> 和 <i>VHA-c1</i> 表达影响	56
3.7.3 实时荧光定量 PCR 分析 NO 对 K ⁺ 转运基因 <i>AKT1</i> 的表达影响 ..	58
第 4 章 讨论	59
4.1 NO 通过增强 Na ⁺ 外排和液泡区域化调控秋茄根部钠、钾离子平衡	59
4.2 NO 通过抑制 K ⁺ 的外流和增强 K ⁺ 的吸收而调控秋茄钠、钾离子平衡 ..	61
4.3 NO 对 Na ⁺ /H ⁺ 逆向转运蛋白与秋茄体内钾稳态平衡的影响	63
4.4 NO 调节盐胁迫下秋茄细胞内钠、钾平衡的信号通路	64
第 5 章 结论	67
参考文献	69
致谢	79

厦门大学博硕士论文摘要库

Content

Chinese Abstract	I
English Abstract	III
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Research progresses of salt tolerance in plants	1
1.1.1 Salt induced damages in plants	1
1.1.2 Reconstruction and its regulatory mechanism of the ion balance.....	2
1.2 Research progresses of nitric oxide in plants.....	4
1.2.1 Physical and chemical properties of nitric oxide	4
1.2.2 Nitric oxide biosynthesis in plants.....	4
1.2.3 The role of nitric oxide in the growth and development of plants and response to environmental stresses	6
1.3 Mechanisms and research progresses of salt tolerance in mangrove plants	8
1.3.1 Morphological adaptation to saline environment in mangrove plants.....	8
1.3.2 Ion balance mechanisms in mangrove plants.....	8
1.3.3 Salt tolerance mechanisms in molecular level in mangrove plants	9
1.4 Basic technique of non-invasive micro-test (NMT)	10
1.5 The purpose and scientific significance of present study	12
Chapter 2 Materials and methods.....	13
2.1 Material culture and treatments	13
2.1.1 Material collection and culture	13
2.1.2 Material treatments	13
2.2 Main reagents, instruments and equipments	13
2.2.1 Main reagents.....	13
2.2.2 Main instruments and equipments	14
2.3 Measurement of Na ⁺ and K ⁺ contents by ICP-MS	14

2.4 X-ray analysis of Na^+ and K^+ distribution in roots of <i>Kandelia obovata</i>	14
2.5 Measurement of net Na^+ and K^+ fluxes using NMT technique	15
2.6 SDS-PAGE and western-blot analysis of salt-tolerance related proteins in roots of <i>Kandelia obovata</i>	16
2.6.1 Protein extraction	16
2.6.2 Western blot	16
2.7 Total RNA extraction and cloning of salt-tolerance related genes in roots of <i>Kandelia obovata</i>	17
2.7.1 Total RNA extraction	17
2.7.2 Cloning of salt-tolerance related genes of <i>Kandelia obovata</i>	17
2.8 Real-time fluorescent quantitative PCR.....	21
2.9 Statistical analysis and graphics.....	22
Chapter 3 Results and analysis.....	23
3.1 Effects of nitric oxide on the concentrations of Na^+ , K^+ and Na^+/K^+ ratio in roots of <i>Kandelia obovata</i>	23
3.2 Effects of nitric oxide on Na^+ and K^+ distribution within roots cell of <i>Kandelia obovata</i>	25
3.3 Effects of nitric oxide on net Na^+ and K^+ fluxes in the roots of <i>Kandelia obovata</i>	26
3.3.1 Steady net Na^+ fluxes	27
3.3.2 Steady net K^+ fluxes.....	27
3.3.3 Effects of pharmacological reagents on net Na^+ , K^+ fluxes.....	27
3.4 Western-blot analysis of protein expression of salt-tolerance proteins affected by nitric oxide	30
3.4.1 Western-blot analysis of protein expression of PM H^+ -ATPase	30
3.4.2 Western-blot analysis of protein expression of PM Ca^{2+} -ATPase.....	31
3.4.3 Western-blot analysis of protein expression of Na^+/H^+ anitporter.....	32
3.5 Cloning of <i>Kandelia obovata</i> <i>SOS1</i> , <i>NHX1</i> , <i>HAI</i> , <i>VHA-c1</i> and <i>AKT1</i> gene ..	33
3.5.1 <i>Kandelia obovata</i> total RNA extraction and quality testing	33

3.5.2 Cloning of <i>Kandelia obovata</i> <i>SOS1</i> gene core fragment	34
3.5.3 Cloning of <i>Kandelia obovata</i> <i>NHX1</i> gene core fragment	37
3.5.4 Cloning of <i>Kandelia obovata</i> <i>HA1</i> gene core fragment.....	39
3.5.5 Cloning of <i>Kandelia obovata</i> <i>VHA-c1</i> gene core fragment	42
3.5.6 Cloning of <i>Kandelia obovata</i> <i>AKT1</i> gene core fragment.....	45
3.6 The condition optimization of real-time quantitative PCR of <i>SOS1</i> , <i>NHX1</i> , <i>HA1</i> , <i>VHA-c1</i> , <i>AKT1</i> gene and <i>18S rRNA</i>	49
3.7 Real-time quantitative PCR analysis of the transcriptional expression of salt tolerance related genes affected by nitric oxide.....	55
3.7.1 Real-time quantitative PCR analysis of the transcriptional expression of Na^+ extrusion related gene <i>SOS1</i> and <i>HA1</i>	55
3.7.2 Real-time quantitative PCR analysis of the transcriptional expression of Na^+ compartmentation related gene <i>NHX1</i> and <i>VHA-c1</i>	56
3.7.3 Real-time quantitative PCR analysis of the transcriptional expression of K^+ transporter gene <i>AKT1</i>	58
Chapter 4 Discussion	59
4.1 Nitric oxide modulates Na^+/K^+ homeostasis by increasing Na^+ extrusion and compartmentation	59
4.2 Nitric oxide modulates Na^+/K^+ homeostasis by decreasing K^+ loss and increasing K^+ absorption.....	61
4.3 The effects of nitric oxide on Na^+/H^+ antiporter in plasma membrane and K^+ homeostasis in plants	63
4.4 The pathway of nitric oxide regulating Na^+/K^+ homeostasis in salt-stressed <i>Kandelia obovata</i> cell	64
Chapter 5 Conclusion	67
References	69
Acknowledgements	79

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

盐害是影响农业生产的重要逆境因素，高盐胁迫对植物产生严重毒害，影响植物的正常生长发育，甚至导致植株死亡，因此对植物耐盐机理的研究具有重要的科学意义。一氧化氮（nitric oxide, NO）作为一种重要的气体信号分子在植物生长发育和抵抗逆境胁迫过程中具有非常重要的作用。已有大量研究表明外源施用 NO 可以缓解盐胁迫对植物造成的伤害，但大多在生理水平进行分析和阐述，而目前对 NO 增强植物耐盐性的分子机制的研究较少，NO 对植物耐盐相关基因表达的调节作用仍不明确。本文以典型的拒盐红树植物秋茄（*Kandelia obovata*）为研究对象，结合电感耦合等离子体质谱仪（inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS）、扫描电镜与能谱分析技术（Scanning electron microscope and X-ray microanalysis）、非损伤微测技术（non-invasive micro-test technology, NMT）、蛋白印迹（Western-blot, WB）及实时荧光定量 PCR（Real-time quantitative PCR, qRT-PCR）等实验手段，研究了外源施用 NO 供体硝普钠（sodium nitroprusside, SNP）对高盐处理下秋茄耐盐性的影响，以期了解 NO 增强植物耐盐能力的生化和分子机理。取得的主要结果如下：

1. 外源施用中等浓度的 SNP（100 μM ）可以显著降低高盐处理下秋茄根中 Na^+ 浓度和提高 K^+ 的浓度，从而降低胞质中 Na^+/K^+ 比值，维持秋茄体内离子平衡进而增强其耐盐性；NO 合成抑制剂和清除剂则加剧高盐处理对秋茄造成的伤害。

2. 通过电镜和 X-ray 微区分析，在 400 mM NaCl 处理下，100 μM SNP 处理显著降低了秋茄幼苗根部皮层和中柱中 Na^+ 的百分比，同时提高了 K^+ 的百分比，从而使秋茄根部胞质中 Na^+/K^+ 比值降低，有利于增强其对高盐环境的耐受能力。然而施用高浓度的 SNP（800 μM ）则显著提高了皮层和中柱的 Na^+/K^+ 比值，打破了秋茄体内的离子稳态，反而对植物造成毒害。表明 NO 对植物抗盐性的调节存在剂量依赖性。

3. 利用非损伤微测技术分析结果显示，SNP 长期处理可以显著增强高盐处理下秋茄根尖 Na^+ 的外排，而 NO 清除剂、质膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白以及质膜 H^+ -ATPase 抑制剂则明显抑制盐处理下秋茄根尖 Na^+ 的外排。与 Na^+ 外排的测定

结果相反, 盐处理下使用 SNP 可以显著降低秋茄根尖处 K^+ 的外流, 并且质膜 H^+ -ATPase 抑制剂明显增强秋茄根尖 K^+ 的外流、造成胞内 K^+ 的缺失。表明 NO 通过增强根尖外排 Na^+ 以及降低 K^+ 外流, 进而维持胞质中较低的 Na^+/K^+ 比值, 最终增强秋茄的耐盐性。此外, 根尖 Na^+ 、 K^+ 外流与质膜 H^+ -ATPase 和 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白密切相关。

4. 通过 Western-bolt 分析, 适宜浓度的 SNP 可显著提高盐处理下介导 Na^+/K^+ 平衡的相关蛋白 (如质膜 Ca^{2+} -ATPase、 H^+ -ATPase 和液泡膜 Na^+/H^+ 逆向转运体) 的表达水平。

5. 为了研究 NO 提高秋茄耐盐性的分子机理, 我们克隆了介导植物体内 Na^+/K^+ 平衡的相关基因 *SOS1*、*NHX1*、*HAI*、*VHAI-c1* 以及 *AKT1* 的部分序列。通过实时荧光定量 RCR 分析了编码 H^+ -ATPase、 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白以及内向整流钾离子通道 *AKT1* 的基因表达水平。五个基因的相对转录水平均在 $100\ \mu M$ SNP 处理下达到最大值, 并可被 NO 合成抑制剂和清除剂所逆转。

总之, 我们的研究结果显示, 外源 NO 供体 SNP 可以通过调节秋茄根部 Na^+/K^+ 平衡进而缓解高盐对植物的伤害, 最终提高秋茄的耐盐性。基于以上研究结果, 我们推测 NO 的这种效应主要是通过提高 H^+ -ATPase 和 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的蛋白及基因表达水平, 进而增强秋茄根部 Na^+ 外排和 Na^+ 区域化, 避免过多的 Na^+ 在胞质中累积; 同时提高 K^+ 转运基因 *AKT1* 的表达, 增强高盐处理下根对 K^+ 的吸收, 进而维持胞质中较低的 Na^+/K^+ 比值, 提高秋茄对高盐的耐受能力。

关键词: 一氧化氮; 红树植物; 秋茄; Na^+/K^+ 平衡; 耐盐性

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库